动 物 学 研 究 2003, Apr. 24 (2): 127~131 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

扬子鳄4个 *Sox* 基因保守区的克隆及序列分析

陈冬生[1]，聂刘旺[1,3]，程双怀[1]，阚显照[1]，王朝林[2]，谢万树[2]
（1. 安徽师范大学 生命科学学院，安徽 芜湖 241000；2. 宣城扬子鳄养殖中心，安徽 宣城 242000）

摘要：参考人 *SRY* 基因 HMG-box 的保守区序列，设计一对简并引物，用 PCR 扩增了扬子鳄 *Sox* 基因的 HMG-box，并对 PCR 产物进行了亚克隆和测序。结果在雌雄个体中均筛选到4个不同的 *Sox* 基因，无性别差异。其序列与人相应的 *SOX* 基因保守区编码序列的相似性分别为91%、96%、100%、96%，分别命名为 *ASSox*1，*ASSox*2，*ASSox*11，*ASSox*22。与其他动物相关的 *Sox/SOX* 基因的聚类分析结果表明，扬子鳄 *Sox* 基因编码的氨基酸序列与进化位置各异的其他动物的 *Sox/SOX* 基因编码的氨基酸序列存在高度的同源性，显示出 *Sox* 基因在系统进化上的高度保守性。

关键词：扬子鳄；*Sox* 基因；序列分析
中图分类号：Q959.6 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2003)02-0127-05

Amplification and Sequencing of *Sox* Gene HMG-box in *Alligator sinensis*

CHEN Dong-sheng[1], NIE Liu-wang[1], CHENG Shuang-huai[1], KAN Xian-zhao[1], WANG Chao-lin[2], XIE Wan-shu[2]
(1. *College of Biological Science, Anhui Normal University, Wuhu* 241000, *China*;
2. *The Breeding Centre of Alligator sinensis, Xuancheng* 242000, *China*)

Abstract: 220 bp fragments of *Sox* gene HMG-box in *Alligator sinensis* were amplified by PCR, and then subcloned and sequenced. Four different *Sox* genes were thus identified in both male and female. The encoded amino acid sequences exhibited 91%, 96%, 100%, and 96% of sequence homology with those reported for human *SOX* gene HMG-boxes, respectively. According to nomination system of human *SOX* genes, the newly identified *Alligator sinensis* *Sox* genes were named as *ASSox*1, *ASSox*2, *ASSox*11, *ASSox*22, respectively. There was no sexual difference in the four fragments. The amino acid sequences coded by *Sox* genes from amphibian, reptile, bird, and human showed a high degree of sequence homology within the respective four clusters, as revealed in phylogenetic tree constructed. The results indicated that *Sox* genes were highly conservative in phylogeney.

Key words: *Alligator sinensis*; *Sox* gene; Sequence analysis

SOX 基因家族的主要特征是具有一个 HMG 保守盒，且其编码的蛋白质可以和 DNA 序列特异性结合，是一类重要的转录调控因子（Pevny et al, 1997），在个体发育过程中 *SOX* 基因对性别分化和组织器官形成起着重要作用。例如 *SOX*9、*Sox*6（人类用 *SOX*，其他动物 *Sox*）在人、鼠的睾丸中表达（Meyer et al, 1997; Connor et al, 1995），*Sox*17、5、6 参与鼠精子的形成（Kanai et al, 1996; Denny et al, 1992），*Sox*24、23 参与鱼类卵母细胞的形成和卵子发生（Kanda et al, 1998; Yamashita et al, 1998）；*SOX/Sox*1、2、3、10、11、19、21、22、30 在人、鼠、鸡、鱼发育的神经系

收稿日期：2002-04-22；接受日期：2003-01-08
基金项目：安徽省自然科学基金资助项目（01043202）；安徽省教育厅自然科学基金重点项目（2001kj113）；安徽省优秀青年基金资助项目；安徽省教育厅自然科学基金资助项目（2002kj128）；安徽师范大学青年基金资助项目（125030）
3. 通讯作者，E-mail: lwnie@mail.ahwhptt.net.cn

统中都有表达（Michael，1999）；*SOX*5、6、9参与人骨骼的形成（Lefebvre et al，1998）；*SOX*18在人脑、心脏和肌肉中有表达（Slavica et al，2000）。此外，*SOX*基因还与人类许多疾病有关：如*SOX*9基因突变可引起CD（campomelic dysplasia）患者骨骼发育异常，同时伴有性反转（Meyer et al，1997）；*SOX*14与肢体缺陷有关，常伴有CMT2B（Charcot-Marie-Tooth neuropathy type ⅡB）神经病（Hargrave et al，2000）；*SOX*10的突变会引发人的Waardenburg-Hirschsprung症，导致神经系统发育缺陷（Kuhlbrodt et al，1998）。因此，对*SOX/Sox*基因的研究不仅可以揭示性别分化和胚胎发育的机制，而且可为某些遗传疾病的诊断和治疗提供分子方面的资料，进而有着非常重要的理论和应用价值。

扬子鳄（*Alligator sinensis*）属爬行纲鳄目鼍科，是中生代恐龙的近亲，被誉为"活化石"，在系统进化上占有重要的地位。目前，已有从扬子鳄中检测到*Sox*基因的报道（Zhang et al，2001），但尚无*Sox*基因序列方面的研究报道。本文首次对扬子鳄的*Sox*基因HMG-box进行了研究，旨在为扬子鳄性别决定的分子机制、胚胎发育及*Sox*基因的进化等研究提供分子资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

扬子鳄3♀、2♂，由宣城扬子鳄养殖中心提供，经解剖鉴定均为性成熟个体。实验用蛋白酶K、$MgCl_2$、dNTP、*Taq*DNA聚合酶、100 bp DNA ladder等均购于Promega公司。引物参照人*SRY*基因HMG-box保守区序列及有关文献（Nie et al，2001a；Zhang et al，2001a）设计［R1：5'-AAGCGACCCATGAA（C\T）GC（A\G\C\T）T（C\T）AT（G\A\C\T）G-3'；R2：5'-ACGAGGTCGATA（C\T）TT（A\G）TA（A\G）T（C\T）（G\A\T\C）GG-3'］，由上海生工生物工程公司合成，用PAGE纯化。该对引物可特异扩增人*SRY*基因HMG-box的保守序列，片段长为216 bp。

1.2 组织DNA的提取

采用Sambrook et al（1989）的方法，从扬子鳄雌雄个体的肌肉组织中分别提取总DNA。

1.3 PCR扩增和产物的克隆

参照Nie et al（2001a）的方法，用PCR扩增雌雄个体的*Sox*基因。循环条件为：97 ℃预变性5 min；94 ℃变性50 s，53 ℃退火50 s，72 ℃延伸50 s，35个循环；72 ℃再延伸10 min；4 ℃保存。1.7%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。余下的PCR产物用纯化试剂盒进行纯化。

分别纯化克隆雌、雄PCR产物，连接反应及细菌转化均按pMD18-T载体试剂盒（TaKaRa公司）说明书进行操作。

1.4 *Sox*基因片段的筛选和测序

采用菌落PCR（引物同上）和SSCP（Nie et al，1999）方法筛选不同阳性克隆。具体步骤是先分别在雌雄内筛选，后在雌雄间筛选。在雌雄中各筛选出210个克隆，然后把4个有差异的阳性克隆委托北京赛百盛公司进行测序。

1.5 *Sox*基因的分析

先利用PC gene软件（PC gene公司）对筛选出的4个*Sox*基因序列进行氨基酸序列推导（引物间可编码氨基酸56个）；再将此4条氨基酸链输入GenBank，与已发表的鱼类、蛙类、爬行类、鸟类、哺乳类等其他30条*Sox/SOX*基因的编码链进行同源性比较。采用MEGA软件（Kumar et al，2001），以基于氨基酸的差异百分比作为遗传距离，NJ法构建聚类树。并根据4个基因与人类相应*SOX*基因编码链的同源性，命名为扬子鳄*Sox*基因（*Sox* of *A. sinensis*，简写为*ASSox*）。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

雌雄扬子鳄均扩出1条带，且带型一致，大小约为220 bp，与男性*SRY*基因扩增带一致（图1）。此结果初步说明了扬子鳄基因组中存在有人*SRY*基因的同源基因。

2.2 扬子鳄的*Sox*基因

在雌雄个体中，均分别筛选到4个不同的*Sox*基因。经比较这4个*Sox*基因为雌雄双方所共有（图2），无性别差异。测序结果见图3，推测编码氨基酸的序列见图4。经GeneBank中同源性检索，得到该4个*Sox*基因与人类相应*SOX*基因编码链的相似性分别为91%、96%、100%、96%，故分别命名为*ASSox*1、*ASSox*2、*ASSox*11和*ASSox*22。

2.3 不同物种*Sox/SOX*基因的聚类结果

由图5可见，*Sox/SOX*家族可分为四大类群：

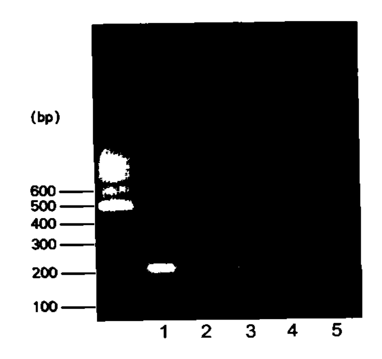


图 1　扬子鳄 *Sox* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1　PCR Amplyfication result of *Sox* gene in *Alligator sinensis*

1，2．雄性；3，4．雌性；5．男性；6．女性；7．阴性对照。
1，2、Male；3，4．Female；5．Man；6．Woman；7．Negative contrast.

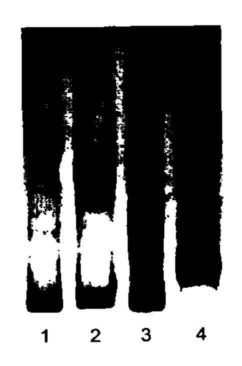


图 2　扬子鳄 *Sox* 基因的 SSCP 分析

Fig.2　SSCP analysis of *Sox* gene in *Alligator sinensis*

1，2，3，4．扬子鳄的 4 个 *Sox* 基因（1、2、11、22）。
1．*ASSox*1；2．*ASSox*2；3．*ASSox*11；4．*ASSox*22.

```
                  111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555
          123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567
ASSox 1   GTG TGG TCC CGG GGC CAG CGG AGG AAG ATG GCC CAG GAG AAC CCT AAA ATG CAC AAC
ASSox 2   ... ... ... ... ... ... ... C.. ..A ... ... ... ... ... ..C ..G ... ... ...
ASSox 11  ... ... ..G AAA AT. G.. A.. ..A ..A ..C ATG G.. C.. TCG ..G G.C ... ... ...
ASSox 22  ... ... ... .A. CA. G.. ... C.. ... ..C ATG G.C C.. TGG ..C G.C ... ... ...

                                                          111 111 111 111 111
          556 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 000 000 000 011 111
          890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234
ASSox 1   TCG GAG ATT AGC AAG CGC CTG GGC GCG GAG TGG AAG CTG CTG TCC GAG GCC GAG AAG
ASSox 2   ... ... ..C ... ... ..G ..C ..G ..C ... ... ..A ..T T.A ... ... ..G ... ...
ASSox 11  G.. ... ..C TC. ... ... ... ... AA. CG. ... ..A A.. ... AAG ..C AG. ... ...
ASSox 22  G.C ... ..C TC. ... ... ... ... CG. CGC ... C.. ... ... CAG ..C T.G ... ...

          111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
          111 112 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666
          567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678
ASSox 1   CGG CCC TAC ATA GAC GAA GCC AAG AGG CTG CAG GCG CAG CAC ATG AAG GAG CAC
ASSox 2   A.A ... .T. ..C ... ... ... ... C.. ..C .GC ..T .T. ... ... ... ... ...
ASSox 11  ATC ..G .T. ..C CGG ..G ..G G.. C.. ... .G. CTC A.. ... ... GCC ..T T..
ASSox 22  ATC ... .T. G.C A.G ..G ... G.. C.C ... .GC CTC A.. ... ... GCC A.C T..
```

图 3　扬子鳄 4 条 *Sox* 基因 HMG-box 区的 DNA 序列

Fig.3　DNA Sequence of 4 *Sox* gene HMG-boxes in *Alligator sinensis*

```
                   1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 555555
          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 123456
ASSox 1   VWSRGQRRKM AQENPKMHNS EISKRLGAEW KLLSEAEKRP YIDEAKRLQA QHMKEH
ASSox 2   .......... .......... .......... .......... F.......R. L.....
ASSox 11  ...KIE...I MEQS.D...A .......KR. .M.KDS..I. F.R..E..RL K..ADY
ASSox 22  ...QHE...I MDQW.D...A .......RR. Q..QDS..I. FVK..E..RL K..ANY
```

图 4　扬子鳄 4 个 *Sox* 基因 HMG-box 区编码的氨基酸序列

Fig.4　Amino acid sequence of 4 *Sox* gene HMG-boxes in *Alligator sinensis*

第一大类群包括了人 *HSOX*11，家鼠 *MSox*4、11、19，鸟类 *LFSox*11，爬行类的密河鳄 *AESox*6，乌龟 *CRSox*11，中华鳖 *TSSox*3，蛙类 *XLSox*4、11，鱼类 *ZfSox*11（斑马鱼），*RtSox*24（虹鳟鱼）；扬子鳄 *ASSox*11 也聚类在这一族，并且与人、鼠、龟、鱼的相应基因编码的氨基酸序列完全相同，与

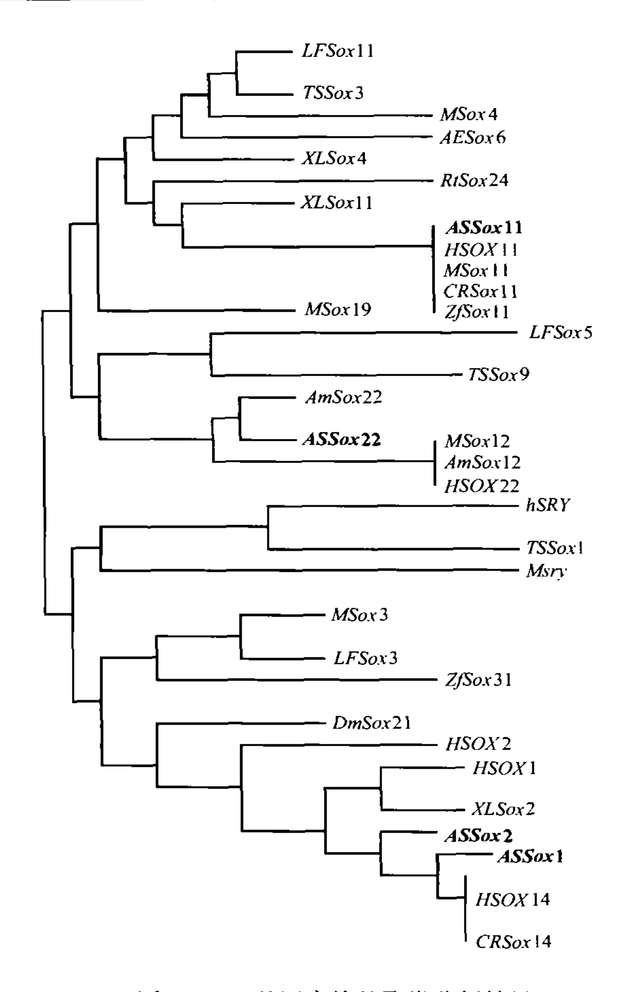


图 5 *Sox* 基因家族的聚类分析结果

Fig.5 Phylogenetic analysis of *Sox*/*SOX* gene family

蛙 *Sox*11 基因的编码序列仅有两个氨基酸的差异。第二大类群包括了人 *HSOX*22，家鼠 *MSox*12，大熊猫 *AmSox*12、22，中华鳖 *TSSox*9，鸟类 *LFSox*5；扬子鳄 *ASSox*22也聚类在这一族，且扬子鳄 *ASSox*22与大熊猫 *AmSox*22 基因的编码序列完全相同，与人 *HSox*11 基因的编码序列仅有一个氨基酸的差异。第三大类群包括了人 *hSRY*、中华鳖 *TSSox*1 和家鼠 *Msry*。第四大类群包括了人 *HSOX*1、2、14，家鼠 *MSox*3，鸟类 *LFSox*3，爬行类的乌龟 *CRSox*14，蛙类 *XLSox*2，鱼类 *ZfSox*31，果蝇 *DmSox*21；扬子鳄 *ASSox*1、2 也聚类在这一族，与哺乳类的家鼠 *MSox* 基因编码序列的同源性分别达到 98%和 96%。

3 讨 论

3.1 扬子鳄性别决定机制的探讨

爬行类性别决定机制有基因型性别决定（genetic sex determination，GSD）和环境型性别决定（environmental sex determination，ESD）等多种类型（Bull，1980），而 ESD 中多数为温度依赖型性别决定（temperature-dependant sex determination，TSD）类型。现存的 22 种鳄类中，有 11 种已被证明其性别分化受孵化温度影响（Jeffery，1994）。扬子鳄卵在 34～36 ℃下孵出的子代全为雄性，32 ℃下雌雄兼有，28～30 ℃全为雌性（Chen，1983），初步证明了扬子鳄的性别决定机制为 TSD。在扬子鳄雌雄个体中均未见异型性染色体的分化（Chen，1991）。一般认为，没有性染色体分化是具 TSD 机制的种类的一个共同特征（Ewert，1994），即具有遗传同质性。本文 *Sox* 基因 PCR 扩增结果中雌雄个体扩增带型的一致性也从分子水平上支持该观点。

3.2 *SOX*（*Sox*）1、2、11、22 的功能探讨

据报道，*Sox*1、2 参与性别决定和分化，在小鼠发育的生殖嵴和泌尿系统中表达（Collignon et al，1996）；*Sox*1 在中华鳖的睾丸中有表达（Nie et al，2001b）；*Sox*11 在低等动物如在斑马鱼发育的中枢神经系统（如前脑、中脑、后脑）及发育早期的眼、耳中表达，在早期胚胎的体节及鳍芽中也有表达（De et al，2000）；*SOX*22 在胎儿及成人的多种器官中都有表达（Jay et al，1997）。聚类分析结果表明，扬子鳄 *Sox* 基因与进化位置不同的其他各类动物的 *Sox*/*SOX* 基因编码的氨基酸序列都存在高度的同源性，如本文结果中的扬子鳄 *ASSox*11 与人、鼠、龟、鱼的相应基因 *SOX*/*Sox*11 编码的氨基酸序列完全相同，扬子鳄 *ASSox*22 与大熊猫 *AmSox*22 基因的编码序列完全相同。由此说明这类基因十分古老，具有进化上的高度保守性；同时也暗示了扬子鳄的 *Sox* 基因在其胚胎发育中承担着与哺乳动物相类似的功能。

致谢：本文在写作过程中得到吴孝兵教授的悉心指导和帮助，在此表示感谢！

参考文献：

Chen BH. 1983. What control the sex of *Alligator sinensis* [J] *Great Nature*, **12**: 89－93. [陈壁辉. 1985. 扬子鳄的性别由什么决定. 大自然, **12**: 89－93.]

Chen BH. 1991. The Amphibians and Reptilian Fauna of Anhui [M]. Hefei: Anhui Publishing House of Science and Technology. 361－365. [陈壁辉. 1991. 安徽两爬动物志. 合肥: 安徽科学技术出版社. 361－365.]

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohentannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Lovell-Badge R. 1996. A comparison of the properties of *Sox*3 with *Sry* and two related genes, *Sox*1 and *Sox*2 [J]. *Development*, **122**: 509－520.

Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. 1995. The Sry-related HMG box-containing genes *Sox*6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse [J]. *Nucleic Acids Research*, **23**: 3365－3372.

Denny P, Swift S, Connor F, Ashworth A. 1992. An *SRY*-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein [J]. *EMBO Journal*, **11**: 3705－3712.

De MS, Yan YL, Jowett T, Postlethwait JH, Varga ZM, Ashworth A, Austin CA. 2000. Expression of *Sox*11 gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development [J]. *Developmental Dynamics*, **217** (3): 279－292.

Ewert MA, Jack DR, Nelson CM. 1994. Patterns of temperature dependant sex determination in turtle [J]. *Experimental Zool.*, **270**: 3－15.

Hargrave M, James K, Nield K. 2000. Fine mapping of the neurally expressed gene *SOX*14 to human 3q23, relative to three congenital diseases [J]. *Human Genetics*, **106** (4): 432－439.

Jeffery WL, Harry VA. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodilian [J]. *Experimental Zool.*, **270**: 28－44.

Jay P, Sahly I, Goze C, Taviaux S, Poulat F, Couly G, Abibol M, Beta P. 1997. *SOX*22 is a new member of the *SOX* gene family expressed in human nervouse tissue [J]. *Human Molecular Genetics*, **6** (7): 1069－1077.

Kanai Y, Kanaiazuma M, Noce T, Saido TC, Shiroishi T, Hayashi Y, Yazaki K. 1996. Identification of two *Sox*17 messager RNA isoforms, with and without the high mobility group box region and their differential expression in mouse spermatogenesis [J]. *Cell Biological Journal*, **133**: 667－681.

Kanda H, Kojima M, Miyomoto N, Ito M, Takamatsu N, Yamashita S, Shiba T. 1998. Rainbow trout *Sox*24, a novel member of *Sox* family, is a transcriptional regulator during oogenesis [J]. *Gene*, **211** (2): 251－257.

Kuhlbrodt K, Schmidt C, Sock E, Pingault V, Bondurand N, Goossens M, Wegner M. 1998. Functional analysis of *SOX*10 mutation found in human Waardenburg-Hirschsprung patients [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 23033－23038.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, **17** (12): 1244－1245.

Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B. 1998. A new long form of *Sox*5 (L-*Sox*5), *Sox*6 and *Sox*9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type Ⅱ collagen gene [J]. *EMBO Journal*, **17**: 5718－5733.

Meyer J, Südbeck P, Held M, Wsgner T, Schmitz ML, Bricarelli BD, Eggermont E, Friedrich V, Haas OA, Kobelt A, Leroy JG, Michel E, Mitulla B, Pfeiffer RA, Schinzel A, Schmidt H, Scherer G. 1997. Mutational analysis of the *SOX*9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: Lack of genotype/phenotype correlations [J]. *Human Molecular Genetics*, **6**: 91－98.

Michael W. 1999. From head to toes: The multiple facets of *Sox* proteins [J]. *Nucleic Acids Research*, **27** (6): 1409－1420.

Nie LW, Shan XN, Guo CW, Wang M, Lu XX. 1999. The PCR amplification and SSCP analysis of *Sox* gene in turtles [J]. *Journal of Applied & Environmental Biology*, **5** (4): 378－381. [聂刘旺, 单祥年, 郭超文, 汪 鸣, 鲁晓萱. 1999. 两种龟类动物 *Sox* 基因的 PCR 扩增及 SSCP 分析研究. 应用与环境生物学报, **5** (4): 378－381.]

Nie LW, Shan XN, Wang M, Guo CW, Lu XX. 2001a. Conservative region sequence analysis of four *Sox* genes in the *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **25** (3): 245－250. [聂刘旺, 单祥年, 汪 鸣, 郭超文, 鲁晓萱. 2001a. 中华鳖 4 个 *Sox* 基因保守区的序列分析. 水生生物学报, **25** (3): 245－250.]

Nie LW, Shan XN, Wang M, Guo CW, Lu XX. 2001b. RT-PCR analysis on *Sox* gene of seven tissues from the *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **47** (6): 718－720. [聂刘旺, 单祥年, 汪 鸣, 郭超文, 鲁晓萱. 2001b. 中华鳖 7 种组织 *Sox* 基因表达的 RT-PCR 分析. 动物学报, **47** (6): 718－720.]

Pevny LH, Lovell-Badge R. 1997. *Sox* genes find their feet [J]. *Curr. Opin. Genet. Dov.*, **7** (3): 338－344.

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Mannual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Slavica S, Milena S. 2000. The human *SOX*18 gene: cDNA clone and high resolution mapping [J]. *BioChemica et Biophysica Acta*, **1492** (1): 237－241.

Yamashita A, Suzuki S, Fujitani K, Kojima M, Kanda H, Ito M, Takamatsu N, Yamashita S, Shiba T. 1998. cDNA cloning of a novel rainbow trout *SRY*-type HMG box protein, *rtSox*23 and its functional analysis [J]. *Gene*, **209**: 193－200.

Zhang HJ, Nie LW, Shan XN, Zhang XA. 2001a. Cloning and sequencing of the *Sox* genes in *Chinemys reevesii* [J]. *Zool. Res.*, **22** (4): 336－339. [张海军, 聂刘旺, 单祥年, 张小爱. 2001a. 乌龟 *Sox* 基因的克隆及测序. 动物学研究, **22** (4): 336－339.]

Zhang HJ, Zhang XA, Cheng SH, Nie LW. 2001b. The PCR amplication and SSCP analysis of *Sox* gene in *Alligator sinesis* [J]. *Journal of Anhui Normal University* (*Natural Science*), **24** (3): 247－249. [张海军, 张小爱, 程双怀, 聂刘旺. 2001b. 扬子鳄 *Sox* 基因的 PCR-SSCP 分析. 安徽师范大学学报 (自然科学版), **24** (3): 247－249.]